

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 07-035752

(43)Date of publication of application : 07.02.1995

(51)Int.Cl. G01N 33/543
G01N 33/543

(21)Application number : 05-181505 (71)Applicant : S R L:KK
(22)Date of filing : 22.07.1993 (72)Inventor : HIRATA MINORU

(54) METHOD FOR IMMUNOLOGICAL ASSAY FOR AGGLUTINATION**(57)Abstract:**

PURPOSE: To enable simple and rapid measurement, automation of measurement and mass treatment by having an antigenic substance in a sample adsorbed in insoluble carrier particles and having an antibody, or antibody composite specific for the antigenic substance reacted with it.

CONSTITUTION: Latex suspension is added to a sample to be examined wherein purified water has been added to whole blood sampled from a human to be hemolyzed and left at 37° C for 20 minutes to have HbA1c in the sample adsorbed into latex. Then composite wherein HbA1c monoclonal antibody originated from mouse ascites and anti-mouse IgG goat blood serum is diluted by GBS-T (Tween 20 has been solved by 0.3% in GBS) and mixed is added to the latex suspension and left at 37° C for 20 minutes to cause selective agglutination reaction of latex. A sample whose HbA1c value is known is used as standard for performing similar agglutination reaction, absorbancy is measured by a spectrophotometer, a standard curve is obtained, and a percentage of A1c in an unknown sample is obtained from the curve.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination] 14.08.1995

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number] 2677753

[Date of registration] 25.07.1997

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

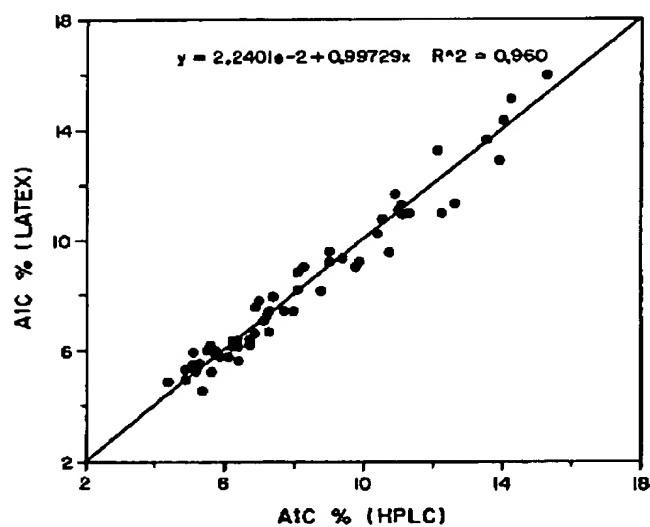
[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2000 Japanese Patent Office

Drawing selection [Representative drawing]

HPLC VS LATEX



[Translation done.]

JAPANESE

[JP,07-035752,A]

CLAIMS DETAILED DESCRIPTION TECHNICAL FIELD PRIOR ART EFFECT OF THE
INVENTION MEANS EXAMPLE DESCRIPTION OF DRAWINGS DRAWINGS

[Translation done.]

*** NOTICES ***

The Japanese Patent Office is not responsible for any damages caused by the use of this translation.

1. This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
2. **** shows the word which can not be translated.
3. In the drawings, any words are not translated.

CLAIMS

[Claim(s)]

[Claim 1] The flocculation immunoassay method characterized by adsorbing or combining the antigenicity matter in a specimen with insoluble support grain, making the antibody or antibody complex which reacts to this antigenicity matter specifically react, and making insoluble support grain condense alternatively.

[Claim 2] The flocculation immunoassay method according to claim 1 to which the antibody or antibody complex which reacts to the antigenicity matter specifically is made to react, without removing this specimen by washing after adsorbing or combining the antigenicity matter in a specimen with insoluble support grain.

[Claim 3] The flocculation immunoassay method according to claim 1 or 2 which is the antibody or antibody complex which the aforementioned antibody or antibody complex does not react to the antigenicity matter which exists in the liquid phase in the native status substantially, but reacts to the antigenicity matter solid-phase-ized by insoluble support specifically.

[Claim 4] The flocculation immunoassay method according to claim 1 or 2 the aforementioned antibody is a monochrome ***** antibody.

[Claim 5] The flocculation immunoassay method according to claim 1 or 2 the aforementioned antibody is a polyclonal antibody.

[Claim 6] The flocculation immunoassay method according to claim 1 or 2 which consists of an antibody to which the aforementioned antibody complex reacts to the antigenicity matter specifically, and a second antibody which reacts to this alternatively.

[Claim 7] The flocculation immunoassay method according to claim 1 or 2 which consists of the biotin indicator field of an antibody with which the aforementioned antibody complex reacts to the antigenicity matter specifically, and an avidin.

[Claim 8] The flocculation immunoassay method according to claim 1 or 2 the aforementioned insoluble support grain becomes an aqueous liquid medium from the particle of an insoluble organic polymeric material, and/or the particle of a mineral matter substantially.

[Claim 9] The flocculation immunoassay method according to claim 1 or 2 the aforementioned insoluble support grain consists of a particle which carried out surface treatment.

[Claim 10] The flocculation immunoassay method according to claim 1 or 2 insoluble support grain is a latex particle of the domain of 0.04-0.8 microns of mean particle diameters.

[Translation done.]

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平7-35752

(43) 公開日 平成7年(1995)2月7日

(51) Int.Cl. ⁸	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
G 0 1 N 33/543	5 8 1 A	9217-2 J		
	F	9217-2 J		
	5 8 3	9217-2 J		

審査請求 未請求 請求項の数10 O L (全 15 頁)

(21) 出願番号 特願平5-181505

(22) 出願日 平成5年(1993)7月22日

(71) 出願人 390037006

株式会社エスアールエル

東京都新宿区西新宿2丁目4番1号

(72) 発明者 平田 稔

東京都八王子市小宮町51 株式会社エスア

ールエル八王子ラボラトリー内

(74) 代理人 弁理士 長谷川 芳樹 (外4名)

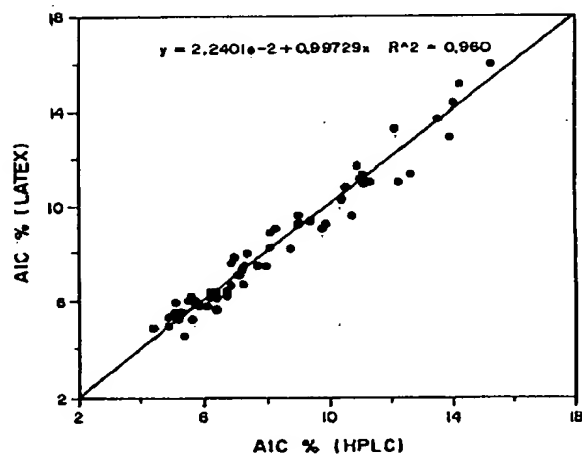
(54) 【発明の名称】 凝集イムノアッセイ法

(57) 【要約】

【構成】 被検試料中の抗原性物質を不溶性担体粒子に吸着させ、該抗原性物質に特異的に反応する抗体もしくは抗体複合体を反応させて、上記不溶性担体粒子を選択的に凝集させる。

【効果】 煩雑な前処理を行うことなく、簡便かつ迅速に被検試料中の抗原性物質もしくは抗体の測定が可能となり、同時に多数検体を並列的に処理することも極めて容易となる。更に、上記の測定法を生化学自動分析機に適用することにより、測定の自動化による検体の大量処理が可能となる。

HPLC VS LATEX



1

【特許請求の範囲】

【請求項1】 被検試料中の抗原性物質を不溶性担体粒子に吸着もしくは結合させ、該抗原性物質に特異的に反応する抗体もしくは抗体複合体を反応させて、不溶性担体粒子を選択的に凝集させることを特徴とする凝集イムノアッセイ法。

【請求項2】 被検試料中の抗原性物質を不溶性担体粒子に吸着もしくは結合させた後、該被検試料を洗浄により除去することなく、抗原性物質に特異的に反応する抗体もしくは抗体複合体を反応させる請求項1記載の凝集イムノアッセイ法。

【請求項3】 前記抗体もしくは抗体複合体が、ネイティブな状態で液相中に存在する抗原性物質には実質的に反応せず、不溶性担体に固相化された抗原性物質には特異的に反応する抗体もしくは抗体複合体である請求項1又は2記載の凝集イムノアッセイ法。

【請求項4】 前記抗体がモノクローナル抗体である請求項1又は2記載の凝集イムノアッセイ法。

【請求項5】 前記抗体がポリクローナル抗体である請求項1又は2記載の凝集イムノアッセイ法。

【請求項6】 前記抗体複合体が、抗原性物質に特異的に反応する抗体と、これに選択的に反応する第二抗体とからなる請求項1又は2記載の凝集イムノアッセイ法。

【請求項7】 前記抗体複合体が、抗原性物質に特異的に反応する抗体のビオチン標識体と、アビジンとからなる請求項1又は2記載の凝集イムノアッセイ法。

【請求項8】 前記不溶性担体粒子が、水性液体媒体に実質的に不溶性である有機高分子物質の微粒子および／又は無機物質の微粒子からなる請求項1又は2記載の凝集イムノアッセイ法。

【請求項9】 前記不溶性担体粒子が、表面処理した微粒子からなる請求項1又は2記載の凝集イムノアッセイ法。

【請求項10】 不溶性担体粒子が、平均粒径0.04～0.8ミクロンの範囲のラテックス粒子である請求項1又は2記載の凝集イムノアッセイ法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】本発明は、生体試料などの流体中における抗原性物質を、凝集反応を利用して免疫学的に測定する方法（凝集イムノアッセイ法）に関する。

【0002】

【従来の技術】近時、病院、検査センター等においては、人手不足、コスト削減、あるいは多量検体処理の要請等の点から、臨床検査等の諸検査の自動化、および／又は測定時間の短縮化が図られてきた。このような自動化に適した方法として、不溶性担体粒子の凝集反応を利用して抗原性物質を定性ないし定量する凝集法が注目されるに至っている。

【0003】免疫化学分野においては、凝集法としてラ

2

テックス凝集イムノアッセイ法が主として行われてきた。当分野において公知のラテックス凝集法とは、例えば特公昭58-11575号公報に記載されているように、生体試料などの流体（被検試料）中における抗原性物質を測定する場合、該被検試料と、該抗原性物質に特異的に結合する抗体もしくはそのフラグメントを担持させたラテックスとを混合して、ラテックスの凝集の程度を測定することにより、前記抗原性物質を検出又は定量するものである。

【0004】この場合、上記抗体としては、通常ポリクローナル抗体が用いられる。モノクローナル抗体は、抗原分子上の特定のエピトープのみと反応するため、該抗原性物質が多価抗原である場合でも、特定のエピトープに関しては多価であるとは限らない。従って、上記抗体としてモノクローナル抗体を用いた場合は、その抗原は、特定のモノクローナル抗体に対応するエピトープに関しては、一価抗原となる可能性が高くなる。

【0005】測定の目的とする抗原物質が一価抗原である場合、ラテックスに担持された抗体と試料中の該抗原性物質とが反応もしくは結合しても、通常、凝集は起こらない。この場合、抗体を担持させたラテックスと、このラテックスを凝集させることの出来る凝集素（例えばポリハプテン）と、被検試料とを混合し、反応させて、被検試料中の抗原性物質がラテックス凝集をどの程度阻害したかを測定することにより、該抗原性物質を検出又は定量する方法（凝集阻害法）が、当分野において公知である。

【0006】従って、多価抗原である蛋白抗原の場合、モノクローナル抗体を用いた凝集法においては、上記した理由で抗原エピトープに関して一価となる可能性があるため、このような蛋白抗原の測定に際しては、その抗原エピトープの部分を含むポリハプテンを用いた凝集阻害法による測定に頼らざるを得ないこととなる。

【0007】したがって一価抗原をモノクローナル抗体を用いて測定する場合、凝集素としてのポリハプテンが新たに必要となるが、そのポリハプテンが生体試料中のネイティブな抗原性物質と同一の反応性を示す保証はない。

【0008】ポリクローナル抗体を用いた通常のラテックス凝集法と、モノクローナル抗体を用いたラテックス凝集阻害法とを比較してみれば、ポリクローナル抗体は同じ品質のものを常に得ることは難しく、特異抗体に精製する段階での該抗体の損失も大きいのに対し、モノクローナル抗体はその点、品質の一定した抗体の大量生産に向いている。このような品質の安定性の点からはモノクローナル抗体の方が有利であるが、モノクローナル抗体を用いた場合、上述したようにラテックス凝集阻害法を用いざるを得ないという難点がある。このような点を考慮して、ポリクローナル抗体を用いた通常のラテックス凝集法が用いられているのが現状である。

【0009】モノクローナル抗体を用いる場合、当然のことであるが、凝集素としてのポリハプテンと反応するモノクローナル抗体を用いることになるが、そのモノクローナル抗体がネイティブな抗原性物質とは反応しない場合もある。このような場合、ネイティブな抗原性物質の反応性をポリハプテンの反応性に近づけるための何らかの処理が必要となると考えられる。

【0010】上述したような諸欠点から、当分野における公知のラテックス凝集法（ないしラテックス凝集阻害法）の限界は明らかである。

【0011】より具体的には、従来のラテックス凝集法においては、分子内に同じエпитープを複数含む糖鎖抗原などの場合を除いては、特定のエпитープしか認識しないモノクローナル抗体は一般的には使用できない。この場合、ラテックス凝集阻害法の応用の可能性が残されているが、凝集素であるポリハプテンとモノクローナル抗体は反応しても、モノクローナル抗体とネイティブな抗原性物質とは反応せず、何らかの処理が必要になる可能性が高い。これは、蛋白抗原の場合、抗体との反応性においては該蛋白抗原の高次構造が重要な役割を果たしているのに対し、凝集素であるポリハプテンはペプチドのポリマー（ないしオリゴマー）であり、上記蛋白抗原そのものとは立体構造が異なることによると考えられる。

【0012】従って、本発明の目的の一つは、抗原性物質に対する新たな凝集イムノアッセイ法を提供することにある。

【0013】より具体的には、本発明の目的は、モノクローナル抗体を用いつつ、より単純で、凝集素を必要としない凝集イムノアッセイ法を提供することにある。

【0014】本発明の他の目的は、より安定で単純な凝集試薬を用いる凝集イムノアッセイ法を提供することにある。

【0015】

【課題を解決するための手段】本発明者は鋭意研究の結果、被検試料中の抗原性物質の測定に際して該抗原性物質に特異的な抗体を担持させた不溶性担体粒子を用いるのではなく、測定試料たる該抗原性物質自体を不溶性担体粒子に吸着させ、該抗原物質に特異的な抗体もしくは抗体複合体を反応させることにより、上記不溶性担体粒子が選択的に凝集することを見出した。

【0016】本発明のラテックス凝集イムノアッセイ法は上記知見に基くものであり、より詳しくは、被検試料中の抗原性物質を不溶性担体粒子に吸着もしくは結合させ、該抗原性物質に特異的に反応する抗体もしくは抗体複合体を反応させて、不溶性担体粒子を選択的に凝集させることを特徴とするものである。

【0017】本発明においては、定量性の確保を容易とする点からは、生体試料の濃度及び不溶性担体粒子懸濁液の緩衝液濃度などは、生体試料中の抗原性物質がその

存在量に比例して不溶性担体粒子に吸着されるよう、測定項目の特性により条件を選ぶことが好ましい。

【0018】本発明においては、不溶性担体粒子に吸着させるべき抗原性物質が多価抗原であるか一価抗原であるかは問題ではない。ただし、微量な生体成分や不溶性担体粒子への吸着が困難な抗原性物質の測定には、本発明の適用は必ずしも容易ではない。

【0019】被検試料中の抗原性物質を不溶性担体粒子に吸着させて、該抗原性物質に特異的に反応するモノクローナル抗体を反応させる場合、固相化されずに液相中に残った抗原性物質（即ち未吸着の抗原性物質）の存在が測定値に影響を与える場合がある。

【0020】より具体的には、上記モノクローナル抗体が、不溶性担体粒子に吸着された抗原性物質のみならず、未吸着の抗原性物質とも反応すると、不溶性担体粒子の凝集が阻害されることになり、不都合が生じる。不溶性担体粒子に抗原性物質を吸着させた後に、該不溶性担体を洗浄して未吸着の抗原性物質を除去することでこの不都合は解決可能であるが、このような洗浄工程の付加は、本発明の凝集イムノアッセイの実用性ないし迅速性を低下させる可能性がある。

【0021】このような場合は、不溶性担体粒子に吸着される抗原性物質の比率を高くすることで、未吸着の抗原性物質の量を実質的に問題とならない量として取り扱うことが可能である。たとえば、1gG（イムノグロブリンG）をラテックスに吸着させる場合、ある条件下においては、液相中に残存する1gGの量を1万分の1にしても、ラテックスに固相化される1gGの量は5分の1にしか減少しないことが知られている（文献名：第16章 医用ラテックス、230～244頁（久下倫生）を参照）。

【0022】本発明者はこのような点を考慮しつつ更に研究を進めた結果、上記本発明においては、上記モノクローナル抗体を液相中の抗原性物質と実質的に反応させることなく、不溶性担体に吸着・固相化された抗原性物質と選択的に反応させることが可能であることを見出した。従って、本発明の好ましい態様によれば、上記凝集イムノアッセイ法において、被検試料中の抗原性物質を不溶性担体に吸着させた後、該被検試料を洗浄により除去することなく、前記抗原性物質に対するモノクローナル抗体を反応させることが可能となる。

【0023】すなわち、本発明のより好ましい具体例においては、使用するモノクローナル抗体として、不溶性担体粒子に吸着された抗原とは反応するが、液相中の未吸着の抗原性物質とは実質的に反応しないものを選ぶことにより、未吸着成分による凝集阻害作用を完全に除外することが可能となる。

【0024】（抗原性物質）本発明の凝集イムノアッセイ法により測定されるべき抗原性物質は、不溶性担体への吸着（ないし結合）が可能で、且つ該抗原性物質に対

応するポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体の少なくとも一方の作成ないし入手が可能である限り特に制限されないが、不溶性担体への吸着の容易性の点からは、生体試料中に $100\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上（更には $1\text{mg}/\text{mL}$ 以上）もしくは（総タンパク重量の）1%以上含まれる物質であることが好ましい。また、上記ポリクローナル抗体ないしモノクローナル抗体作成の容易性の点からは、上記抗原性物質は分子量10,000以上の物質（蛋白質等）であることが好ましい。

【0025】本発明の凝集イムノアッセイ法により測定されるべき「抗原性物質」は、これに対応するポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体の少なくとも一方の作成ないし入手が可能なるものであればよい。

【0026】（抗原性物質に特異的な抗体）本発明において、「抗原性物質に特異的に反応する抗体」としては、ポリクローナル抗体および／又はモノクローナル抗体のいずれを用いることも可能である。

【0027】このようなモノクローナル抗体は、Koe hler & Milstein (Nature, 256, 495~497, 1975)らの報告した細胞融合法により得ることが出来る。この方法自体は常法であり、あらためて述べる必要はないが、この方法においては、目的とするモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ細胞を効率よく選別する必要がある。大量検体処理が容易であることから、96穴プレートに所定の抗原を固相化させ、それにハイブリドーマ細胞の培養上清を反応させ、更に酵素標識抗マウスイムノグロブリンを反応させる、いわゆるELISA法（酵素免疫測定法）による選別が行われることが多い。この際、抗原は固相化されているため、抗原が固相化されている状態で抗体を反応させるアッセイ系を組む場合には、この選別法でよいが、ELISA法で選別して得たハイブリドーマ細胞の産生するモノクローナル抗体の中に、ラジオイムノアッセイ（RIA）のように、抗原と抗体とを液相中で反応させるアッセイ系では反応しないという抗体が存在する場合が、見受けられることがある。

【0028】このような現象自体は当分野においては公知ないし周知のことであるが、本発明の凝集イムノアッセイ法においてこのようなモノクローナル抗体を用いることにより、液相中の抗原性物質の阻害を受けずに、不溶性担体粒子に固相化された抗原性物質と特異的に反応させることが可能となる。

【0029】ところで、分子量が通常の抗体分子である 1gG よりも小さい、例えば分子量7万程度の抗原性物質を測定する場合を考えてみる。従来技術によれば、該抗原性物質に対する抗体をラテックス表面に吸着させる。このとき、抗体分子はFc部分でラテックスに吸着し、Fab部分を外に向けて存在しており、かなり整然とした方向性をもっていることが知られている（例えば、文献名：第16章 医用ラテックス、230~24

4頁（久下倫生）参照）。したがって、本発明者の検討によれば、従来技術においては、ラテックス表面から 1gG 分子が腕をのばしており、ラテックス同士の間で抗原分子がそれぞれの 1gG 分子と結合するという形になり、ラテックス間の距離は分子量15万の 1gG 分子2つ分と分子量7万の抗原分子1つ分ということになる。

【0030】これに対して、本発明による方法においては、該抗原性物質を不溶性担体（例えばラテックス）に吸着させ、該ラテックスに吸着された抗原分子に特異的に反応する抗体が、Fab部分を広げて結合するという形をとると考えられる。したがって、ラテックス間の距離は分子量15万の 1gG 分子1つ分と、分子量7万の抗原分子2つ分ということになり、従来技術と比較して本発明では、このような測定の場合に、ラテックスを凝集させるために該ラテックス粒子同士をより接近させることが重要になると考えられる。

【0031】ラテックス粒子同士は通常、負の表面電荷により反発しあっているため、比較的分子量の小さい分子を測定する場合に、従来法よりもラテックス同士をより接近させることが重要である本発明では、それだけ強い凝集力を発生させることが好ましいと考えられる。したがって、本発明においては、より凝集力の強い抗体を用いることが好ましいということになる。

【0032】しかし、本発明において測定すべき抗原性物質が 1gG 分子（分子量約15万）よりも巨大である場合は、逆のこと（より凝集力の弱い抗体で足りる）も成り立つ可能性がある。

【0033】本発明による凝集イムノアッセイ法においては、上述したような理由から、抗原性物質をラテックス等の不溶性担体に吸着させた後、モノクローナル抗体を反応させてもラテックスが凝集しない可能性が考えられるが、そのような場合でも、次のような手段で凝集を起こさせることが可能である。

【0034】表面の負電荷によるラテックス粒子同士の反発力は、ラテックス同士の距離が大きくなれば小さくなる。したがって、モノクローナル抗体の立体構造を大きくすれば、同じ抗体でも凝集を起こすことができる。より具体的には、該モノクローナル抗体と、これに選択的に反応する第二抗体とを反応させてモノクローナル抗体複合体を形成させ、該抗体複合体を、抗原を吸着させたラテックスと反応させれば、ラテックス粒子同士が少し離れた距離で（すなわち、より小さな力で）結合して凝集を起こすことができるようになると考えられる。

【0035】他に、抗体複合体を形成する方法としては、モノクローナル抗体をビオチン標識し、アビジンを加えて複合体とする方法、更に、化学結合による方法（例えば、抗体を酵素標識する際に用いられる方法）等を挙げることが出来る。

【0036】本発明において用いられる抗体複合体は、

1 g G型抗体分子（分子量約15万）を2分子以上含むことが好ましく、また、その分子量は1 g G型抗体分子の分子量の3倍以上であることが好ましい。

〔0037〕本発明の凝集イムノアッセイ法においては、上述した理由から、抗原性物質に特異的に反応する抗体として、五量体の抗体である1 g M型のモノクローナル抗体を用いることが、該1 g M型抗体の強い凝集力の点から好ましい。

〔0038〕ラテックス凝集反応で、リウマチ因子（変性1 g GのFc部分に対する自己抗体）を検出する場合、凝集を起こすのは1 g M型のリウマチ因子であることは、当分野では公知のことである（例えば、文献名：臨床免疫、21（Suppl. 14）80-84、1989参照）。すなわち、当分野では、抗原が感作されたラテックスに1 g M型のリウマチ因子を反応させると凝集するが、1 g G型のリウマチ因子を反応させても凝集しないとされている。

〔0039〕以上、主にモノクローナル抗体について述べてきたが、ポリクローナル抗体を用いて、本発明の凝集イムノアッセイ法を行うことも可能である。ただし、ポリクローナル抗体の場合には、単一のエピトープのみを認識するモノクローナル抗体の場合と異なり、固相化された抗原とは反応するが液相中の抗原とは反応しない抗体を選択することは容易ではないと考えられる。したがってポリクローナル抗体を用いる場合には、被検試料中の抗原性物質を不溶性担体に吸着（ないし結合）させる段階において、前述したような、未吸着の抗原性物質が実質的に無視できる程度になるように吸着の効率のよい条件を選択することが好ましい。

〔0040〕また、ポリクローナル抗体と反応する抗原上の反応サイトは複数あるため、ポリクローナル抗体は通常、モノクローナル抗体と比べて凝集力が強いと考えられる。すなわち、本発明において被検試料中の抗原性物質をラテックス等の不溶性担体に吸着させる際に、抗原性物質が液相中にも残ると、加えたポリクローナル抗体は固相、液相両方の抗原と反応できるため、ポリクローナル抗体が液相中の抗原とも反応して不溶性担体粒子同士を架橋することで凝集力が大きくなると考えられる。

〔0041〕上述したように本発明によれば、不溶性担体粒子に吸着ないし結合させた抗原性物質に、該抗原性物質に特異的な抗体もしくは抗体複合体を反応させることにより、不溶性担体の選択的な凝集を起こすことが出来る。

〔0042〕上述したように本発明によれば、試薬の製造が単純、容易であるため、保存安定性の高い試薬を用いた方法を提供することが出来る。

〔0043〕より具体的には、当分野においては、不溶性担体として一般にラテックスが用いられているが、このラテックス試薬（抗原、抗体等が担持されたラテック

ス）について、常に同等の品質のものを作り、非特異凝集や沈殿が生ずることを防止しつつ、安定な状態で保存することは容易なことではない。

〔0044〕これに対し、本発明によれば、不溶性担体（ラテックス等）に抗原や抗体は実質的に感作されていないため、該不溶性担体として市販の未感作ラテックスをそのまま使用することが可能となる。更に抗体についても必ずしも精製品である必要はなく、また試薬が単純なため保存安定性を高く保つことが可能となり、製造業者にとっても有利な方法といえる。

〔0045〕以下、必要に応じて図面を参照しつつ本発明を詳細に説明する。

〔0046〕（不溶性担体粒子）本発明の凝集イムノアッセイ法の開発過程において、本発明者は、抗原性物質を不溶性担体に固相化する時間は極めて短いことを観察した。そこで、本発明者は、抗原性物質を含む水溶液の被検試料をそのまま不溶性担体に固相化することを試み、本発明を完成するに至った。

〔0047〕本発明に用いる不溶性担体としては、例えば、従来技術（特公昭58-11575号公報等）にいうところの有機高分子物質の微粒子や、無機酸化物の微粒子、あるいは核となるこれらの物質の表面を有機物等で表面処理した微粒子が好ましく用いられるが、これらに制限されるものではない。本発明においては、上記不溶性担体として、ポリスチレンラテックス等のラテックスが特に好ましく用いられる。本来ラテックスとは、ゴムの木を傷付けたときに浸出する乳液のことであるが、本発明でいうラテックスとは、水性液中において不連続な微粒子が懸濁している懸濁液ないし乳濁液をいう。

〔0048〕定性反応で用いる場合を除き、定量的にイムノアッセイを行う場合、通常は、粒子の大きさの均一性、表面状態の制御、内部構造の選択などが高度の次元で要求されるが、このような試薬向けの良好なラテックス粒子は、市販品の中から選択して用いることが可能である。

〔0049〕例えば、ラテックス粒子としては、平均粒径0.04~0.8ミクロン（更には0.08~0.2ミクロン）程度のものが好ましく用いられる。

〔0050〕ラテックスの材質は特に制限されないが、ポリスチレンラテックス等のスチレン系ラテックス、アクリル酸系ラテックス等が好ましく用いられる。表面の疎水性が強いラテックス（例えばポリスチレンラテックス）を用いることは、タンパク質ないしペプチドの吸着をスムーズにする上で好ましい。更には、種々の変性ラテックス（例えば、カルボン酸変性ラテックス）、磁性ラテックス（磁性粒子を内包させたラテックス）等を必要に応じて用いてもよい。

〔0051〕ラテックス粒子としては、乳化剤を用いない乳化重合によって得られるポリスチレン粒子が特に好ましく用いられる。このようなラテックスは、表面の負

10

20

30

40

50

電荷同士の反発に基づき、乳化剤なしでも安定に存在できる。

【0052】被検試料中の抗原性物質をラテックス粒子に吸着させるためには、ラテックス粒子を懸濁させる緩衝液については、ELISA等でプレートに抗原を固相化させる場合と基本的に同じ技術が使用可能である。ラテックス粒子によっては、自然凝集を起こしやすいものもあるが、このような場合には、弱アルカリ性のグリシン緩衝液もしくはホウ酸緩衝液に懸濁させておくことが安定性の点から好ましい。ラテックス濃度に関しては、0.05～1重量パーセントの懸濁液として用いることが好ましい。

【0053】（抗原-抗体反応）本発明においては、被検試料中の抗原性物質を固相化した後、該抗原性物質に対して特異的に反応する抗体もしくは抗体複合体を反応させ、ラテックス等からなる不溶性担体を凝集させる。この際に用いる水性溶液は、該抗体もしくは抗体複合体がラテックス等からなる不溶性担体に吸着するのを防ぐために、Tween 20等の界面活性剤を0.1～0.3%程度含んでいることが好ましい。

【0054】（凝集反応）本発明の凝集反応を行う容器は特に限定されないが、通常のチューブ（試験管；例えばポリスチレン製）状の容器を用いることが可能である。多数検体の同時処理が容易な点を考慮すれば、複数のウェル（穴）を有するELISA用プレート（例えば、96-ウェルELISA用プレート（NUNC-IMMUNO PLATE等））を用いることが可能である。後述するように、光学的手法によるラテックス凝集の測定を容易とする点からは、実質的に透明な容器を用いて反応を行うことが好ましい。なお、後述するような自動分析機を利用する場合には、通常は、該分析機中の反応槽中で凝集反応を行わせることとなる。

【0055】（凝集の測定）不溶性担体粒子の凝集の程度を測定する方法は、特に制限されない。例えば、凝集を定性的ないし半定量的に測定する場合には、既知の試料の濁度の程度との比較から、上記不溶性担体粒子の凝集の程度を目視によって判定する（凝集の少ないものは透明感がある）ことも可能である。該凝集を定量的に測定する場合、簡便性の点からは、例えば光学的に測定することが好ましい。

【0056】ラテックス等からなる不溶性担体粒子の凝集の光学的測定法としては、公知の方法が利用可能である。より具体的には例えば、いわゆる比濁法（凝集塊の形成を濁度の増加としてとらえる）、粒度分布による測定法（凝集塊の形成を粒度分布ないし平均粒径の変化としてとらえる）、偏分球濁度法（凝集塊の形成による前方散乱光の変化を偏分球を用いて測定し、透過光強度との比を測定する）等の種々の方式が利用可能である。これらのそれぞれの測定法について、速度試験（レートアッセイ；異なる時点で少なくとも2つの測定値を得て、

これらの時点間における該測定値の増加分（すなわち増加速度）に基づき凝集の程度を求める）と、終点試験（エンドポイントアッセイ；ある時点（通常は、反応の終点と考えられる時点）で1つの測定値を得て、この測定値に基づき凝集の程度を求める）が利用可能である。測定の簡便さ、迅速性の点からは、比濁法を用いた速度試験を行うことが好ましい。

【0057】不溶性担体粒子の凝集の光学的測定においては、ラテックス等からなる不溶性担体粒子の平均粒径が0.04～0.8ミクロン程度の範囲では、500～1400nm程度の波長の光を用いて測定することが好ましい。

【0058】（ヘモグロビンA1c測定例）本発明の凝集イムノアッセイ法の特徴をよく示す一つの実施態様として、以下にヘモグロビンA1c（HbA1c）の測定例について述べるが、本発明の凝集イムノアッセイ法はヘモグロビンA1cの測定に限定されるものではない。

【0059】ここに上記「ヘモグロビンA1c」は、ヘモグロビン（Hb）のβ鎖N末端のアミノ酸残基であるバリンのα-アミノ基にグルコースが非酵素的に結合し、グリコシル化ヘモグロビンとなったものであり、このヘモグロビンA1cの血中量は糖尿病の比較的長期の血糖コントロール状態を反映する。したがって、このHbA1cを測定することは、血糖コントロール状態を知る上で臨床的に極めて有意義である（例えば、日本臨床、48、増刊号、315-322（1990）参照）。

【0060】ヘモグロビンはα鎖2本、β鎖2本からなるヘテロテトラマーであるが、ヘモグロビンA1cは2本のβ鎖のうち1本のN末端のαアミノ基がグリコシル化していることが特徴であり、従って、ヘモグロビンA1cに特徴的な反応部位は1カ所である。換言すれば、ヘモグロビンA1cに特異的なモノクローナル抗体との反応性の面からは、ヘモグロビンA1cは一価抗原として機能する。

【0061】ヘモグロビンA1cを測定するに際しては、従来技術を用いてラテックス凝集阻害法により測定を行うことが考えられるが、特開平1-150857号公報によれば、ラテックスに担持させたモノクローナル抗体は凝集素であるポリハプテンとは反応して凝集を起こすが、生体試料中のネイティブなヘモグロビンA1cはモノクローナル抗体とは反応せず、そのために被検試料に例えば塩酸グアニジンを加えて56℃、15分間加熱する等の前処理が必要とされている。

【0062】ヘモグロビンA1cの測定に関しては、更に特有な問題があった。すなわち、ヘモグロビンA1cは従来より高速液体クロマトグラフィー（HPLC）によって測定され、全ヘモグロビン中のヘモグロビンA1cの分画%が求められてきた。従って、上記特開平1-150857号公報によれば、ラテックス凝集阻害法を行ってヘモグロビンA1cの分画%を求めるためには、別途ヘモ

グロビンの定量を行うことが必須であった。

【0063】本発明の凝集イムノアッセイ法によれば、ヘモグロビンA1cの測定に関しては、例えば、被検試料（例えば、全血に精製水を加えて溶血したもの）をラテックス（不溶性担体）に吸着させ、抗ヘモグロビンA1cモノクローナル抗体複合体を反応させることにより、ラテックスの選択的凝集を起させることができ、この選択的凝集の程度を測定することにより、ヘモグロビンA1cを定量することができる。HPLCで測定したヘモグロビンA1c%値が既知の標準試料を、本発明の凝集イムノアッセイ法により同時に定量して検量線を作成することにより、この検量線に基づき未知の試料のヘモグロビンA1cの分画%値を求めることができる。

【0064】（抗HbA1cモノクローナル抗体）抗HbA1cモノクローナル抗体としては、吸着ないし固相化されたHbA1cに対して実質的に反応し、固相化されたHbA0と実質的に反応しない（好ましくは、更に液相中のHbA1c及びHbA0と実質的に反応しない）抗HbA1cモノクローナル抗体であれば、特に制限なく用いることができる。本発明者の検討によれば、一般に、糖化ペプチドを免疫原としてモノクローナル抗体を作製すると、このようなモノクローナル抗体を得ることができる。ここでHbA1cおよびHbA0に対する反応性は、例えば以下のようにして測定可能である。

【0065】例えば、固相化されたHbA1cと反応し、HbA0とは反応しないことは次のようにして測定することが可能である。

【0066】96穴（ウェル）ELISA用プレート（例えばNUNC社；NUNC-IMMUNO PLATE, MAXISORP F96（4-42404））にHbA1c（例えば、EXOCELL社製；精製HbA1c）を、その濃度が5μg/mLになるように0.05Mクエン酸緩衝液（pH5.6）で希釈した後、各ウェルに50μLづつ分注する。このプレートを4℃で一晩放置してHbA1cをELISAプレートに固相化する。

【0067】このプレートをPBS-T（0.01Mリン酸緩衝液pH6.8/0.15MNaCl/0.1% Tween 20）で4回洗浄した後、抗HbA1cモノクローナル抗体を含む試料（例えば、ハイブリドーマ培養上清）50μLを加え、室温（約25℃）で2時間放置して反応させる。PBS-Tで4回プレートを洗浄した後、POD（ペルオキシダーゼ）標識抗マウスIgG（例えばCAPPEL社製、3711-0081）をPBS-Tで5000倍希釈し、50μL加え、室温で1時間反応させる。

【0068】PBS-Tで4回洗浄後、基質溶液（0.1% o-フェニレンジアミン（シグマ社製）/リン酸-クエン酸緩衝液（クエン酸1水和物7.3g/リン酸2ナトリウム12水和物2.9g/精製水1L）/0.003% H₂O₂）100μLを加え、室温で30

分間反応させた後、2N-硫酸を50μL加え、酵素反応を停止させる。次いで、イムノプレートリーダー（ダイナテック社製、MR5000）を用いて上記酵素反応後の溶液の490nmにおける吸光度（OD）を求める。

【0069】上記で用いたHbA1cに代えてHbA0（例えばEXOCELL社製；精製HbA0）を用いる以外は上記と同様に実施することにより、モノクローナル抗体とHbA0との反応性を同様にOD値で求めることができる。

【0070】本発明においては、抗HbA1cモノクローナル抗体は、HbA1cと上記イムノプレートリーダーのスケールで1.0以上（更には2.0以上）の反応性を示すことが好ましく、また、HbA0とは0.1以下（更には0.05以下）の反応性を示すことが好ましい。

【0071】一方、上記したモノクローナル抗体が、固相化したHbA1cとは反応するが、液相中のHbA1cやHbA0とは反応しないことは、次のようにして測定可能である。

【0072】HbA1c 100μLに対して0.2Mグリシン緩衝液（pH2.5）を100μL加え、室温に5分間放置する。そこにPBS-Tを800μL加え、攪拌したのち、その100μLに抗ヘモグロビンA1cモノクローナル抗体（ハイブリドーマ培養上清、50倍希釈）を100μL加え、室温に30分間放置する。そして、そのうちの100μLを、あらかじめHbA1cを固相化（5μg/mL、100μLを96穴プレートに加え、4℃で一晩放置することにより固相化し、PBS-Tで4回洗浄したもの）した96穴プレートに加え、室温で2時間反応させる。

【0073】PBS-Tで洗浄4回行なった後POD標識抗マウスIgG抗体（5000倍希釈）を100μL加え、室温で1時間反応させる。PBS-Tで4回洗浄後基質反応を室温30分間行ない、停止液を加えて490nmのOD値を測定する。上記で用いたHbA1cに代えて、HbA0を用いる以外は上記と同様に実施し、モノクローナル抗体とHbA0との液相中での反応性を求めることができる。

【0074】以上はヘモグロビンを変性させた場合であり、対照として、HbA1c、HbA0を未変性のまま反応させるため、グリシン緩衝液100μLを加えるところを純水100μLに変更した以外は上記と同様に実施し、液相中でのモノクローナル抗体との反応性を求めることができる。

【0075】本発明においては、抗HbA1cモノクローナル抗体は、未変性のHbA1cやHbA0、さらには変性したHbA0などとは、液相中では10μg/mL（更には20μg/mL）でも反応性を示さず、一方、変性HbA1cとは液相中で1μg/mL（更には0.5

$\mu\text{g}/\text{mL}$) 以下でも反応性を示すことが好ましい。

【0076】本測定においては、HbA1cおよびHbA0は精製して用いることが好ましい。この精製HbA1cおよびHbA0としては市販品を用いることが可能であるが、適当な市販品が無ければ、HPLCで精製して用いてもよい。この精製においては、たとえば、ヒト全血50 μL をPBS 2mLで遠心洗浄し、上清を捨て、赤血球であるペレットに純水2mLを加えて溶血させる。これをHPLCで分画し、HbA1cとHbA0のピークを分取する。

【0077】HPLCの分離条件は、たとえば以下の条件が好ましく用いられる。

【0078】分析機器：島津HPLCシステム
カラム：ヘモグロビン分離用高分解能カラム MICROPEARL (積水化学工業株)

溶離液A：Low Phosphate、(Auto A1c, P type (京都第一化学))

溶離液B：High Phosphate、(リン酸1カリ8.5g、リン酸2カリ12.5g、塩化カリウム3.5g、精製水1L)

移動相：A+B

0~3.5min B濃度 0%

3.5~4.0min B濃度 0%から80%へのグラジェント

4.0~17.0min B濃度 80%

流速：1mL/min

モニター：吸光度 415nm

サンプル量：20 μL

(抗HbA1cモノクローナル抗体と結合する抗体)

上記した抗HbA1cモノクローナル抗体(以下、モノクローナル抗体を「MAb」とも記載する)と選択的に結合する抗体(以下、「第2抗体」という)としては、該MAbが由来する動物種の精製イムノグロブリンと、オクタロニー法において実質的に反応性を示す抗体であれば、特に制限なく用いることができる。

【0079】本発明において、精製イムノグロブリンと第2抗体との反応性は、例えば、以下の方法によって評価することができる。

【0080】アガロースを1%になるように生理食塩水に加え、加熱して溶解させ、厚さ1.5mmのアガロース平板を作製し、このアガロース平板に、径3mm、間隔2mmの穴(7穴)をパンチャーで開ける。

【0081】精製マウスIgG(たとえば、ZYME Laboratories Inc. 品番02-6502)を0.5mg/mL、0.125mg/mLに0.15M塩化ナトリウムで調製したもの10 μL を間隔2mmの7穴の中央の穴に、第2抗体(例えば、抗マウスIgGヤギ血清)は0.15M塩化ナトリウムで4倍、8倍、16倍、32倍、62倍、128倍、に希釈したもの各10 μL を周辺の穴に加え、湿潤中に放置することによりア

ガロース中を拡散させ、沈降線を形成させる。室温で4~5時間後に、精製マウスIgGに対して抗血清の何倍希釈まで沈降線が形成可能かを肉眼で観察する。

【0082】本発明に用いる第2抗体は、少なくとも8倍希釈まで精製マウスIgGと沈降線を形成することが好ましく、少なくとも32倍希釈(更には64倍希釈)まで沈降線を形成することが更に好ましい。

【0083】次に、本発明においてHbA1cを測定する場合の好ましい一実施態様について述べる。

【0084】本発明においては、各チューブに、通常、被検試料として溶血液1~20 μL (更には2~5 μL)程度を採取する。実際に用いる溶血液としては、被検試料(例えば、全血50 μL に純水1mLを加えたもの)を5~10倍程度にグリシン緩衝液等で希釈して用いることもできる。

【0085】次いで、各チューブに、ラテックス懸濁液(例えば0.12 μm ラテックス、0.2%濃度)を100~300 μL (更には150~200 μL)程度加えて、37℃で1~30分(更には3~10分)程度放置して、ラテックスに試料中のHbA1cを吸着させる。この際用いるラテックス懸濁液は、ラテックス原液をグリシン緩衝液等で希釈して用いることが好ましい。

【0086】次いでラテックスに吸着させたHbA1cに、抗HbA1cモノクローナル抗体(例えばマウス腹水由来のモノクローナル抗体)と第2抗体との複合体を含む溶液を100~300 μL (更には150~200 μL)程度加え、37℃で2~30分(更には3~10分)程度放置(インキュベーション)して、HbA1cとモノクローナル抗体とを反応させる。この際に用いるモノクローナル抗体複合体溶液の濃度は、たとえば抗HbA1cモノクローナル抗体と抗マウスIgG抗体を用いる場合、それぞれの抗体の希釈系列を作り、最適濃度を求めることが好ましい。希釈に用いる緩衝液は、たとえば、0.05~0.1Mグリシン緩衝液(GBS; glycine buffered saline; pH 8.2~8.5, 0.15M NaClを含む)などをあげることができる。この際用いる緩衝液には界面活性剤(Tween 20等)を0.1~0.5%(更には0.2~0.3%)程度加えておくことが、モノクローナル抗体のラテックス表面への物理吸着を防ぐ点から好ましい。

【0087】なお、実際の測定において、生化学自動分析機(例えば日立製作所製、7150型自動分析機)を用いて測定する場合、例えば試料量3~15 μL 程度、試薬量1~350 μL 程度が好適に用いられる場合には、一例として、以下のような量比及び反応時間が好ましく用いられる。

【0088】

被検試料： 4 μL
ラテックス懸濁液： 200 μL (反応時間5分)
モノクローナル抗体複合体： 200 μL (反応時間5

分)

【0089】

【実施例】以下、製造例、実施例により本発明の凝集イムノアッセイ法を更に具体的に説明する。

【0090】製造例1

(ヘモグロビンA1cβ鎖N末端のグリコペプチドエピートに対するモノクローナル抗体の作製)ヘモグロビンβ鎖のN末端アミノ酸配列に相当するペプチドを合成し、N末端アミノ酸残基であるValのα-アミノ基にグルコースを非酵素的に結合させて、グリコペプチドを合成し、更にスパーサーを介してキャリアー蛋白に結合させ、それを免疫原としてモノクローナル抗体を得た。

【0091】具体的には、以下のようにして行った。

【0092】Fmoc-L-Valine, Nα-Fmoc-Nim-Trityl-L-Histidine, Fmoc-L-Leucine, Fmoc-O-t-Butyl-L-Threonine, Fmoc-L-Proline, 及びFmoc-s-trityl-L-Cysteine (いずれもペプチド研究所製)を用いて、Val-His-Leu-Thr-Pro-Cys およびVal-His-Leu-Cys のペプチドを合成した(なお、Cys(システイン)は、スパーサーの一部である)。合成は市販のペプチド合成機(Applied Biosystems, Model 430A)を用いて行った。ペプチド合成後、固相である樹脂からペプチドを脱離させて粗ペプチドを得た。

【0093】粗ペプチドを1mg/mLになるように精製水に溶かし、4℃に冷却した。モル比1.5倍量の2,2'-ジチオジピリジンを攪拌しながら滴下し、10分間反応させて、システインのSH基を保護した。凍結乾燥後、1%酢酸に溶かし、不溶物を遠心除去した後、Sephadex G25(15×900mmカラム)でゲルろ過して得たペプチド分画を凍結乾燥した。このペプチドを酢酸に溶かし、ピリジン存在下でモル比2倍量のグルコースを添加し、室温で約10日間攪拌した。ペプチドが糖化されるとHPLCでのリテンションタイム(保持時間)が短くなることから、反応の進行状況はHPLCでチェックした。

【0094】HPLCによる分析条件は以下の通りである。

【0095】カラム:TSKgel, ODS-120A (4.6×250mm, 東ソー社製)

機器:島津HPLCシステム

移動相:10%アセトニトリル/0.1%トリフルオロ酢酸から60%アセトニトリル/0.1%トリフルオロ酢酸への直線勾配

流速:0.8mL/min

時間:25min

モニター:吸光度 280nm

この糖化ペプチドを最終的にHPLCで精製し、凍結乾燥した。

【0096】分離条件は以下のとおりである。

【0097】カラム:TSKgel, ODS-120A (21.5×300mm, 東ソー社製)

移動相:10%アセトニトリル/0.1%トリフルオロ酢酸から60%アセトニトリル/0.1%トリフルオロ酢酸への直線勾配

流速:5mL/min

モニター:吸光度 280nm

凍結乾燥した上記ペプチドを0.1Mリン酸カリウム緩衝液(pH8.5)に溶かし、システイン保護基を脱離するため、3倍量のDTT(Dithiotreitol)を加え、窒素ガスを満たして24時間反応させた。そして塩酸でpHを5に下げた後、上記と同様にHPLCで精製し、凍結乾燥し、最終的に糖化ペプチドを得た。ただし、280nmの吸光度に代えて215nmの吸光度を測定した。

【0098】この糖化ペプチドに、スパーサーとしてEMCS(N-succinimidy 6-maleimidocaproate)を用い、常法によりキャリアー蛋白(水溶性蛋白としてThyroglobulin, 不溶性蛋白としてEdestin(ともにFukushima社製)に結合させ、免疫原とした。

【0099】上記免疫原100μgを完全フロインドアジュバント(Complete Freund's Adjuvant)でw/o(water in oil)型ミセルとし、Balb/c、マウス(8週令)の腹腔中に注射した。追加免疫は免疫原を不完全フロインドアジュバント(Incomplete Freund's Adjuvant)でw/oミセルとし、1ヶ月の間隔で2回行なった。細胞融合の3日前に生食(生理的食塩水)中の免疫原を皮下注射し、これをブースターとした。

【0100】細胞融合は常法により行なった。すなわち、脾臓から脾細胞をとり、これをマウス・ミエローマ株細胞(PA1, 東京理大、新井研究室提供;癌研究リサーチソースバンク(JCRB)にて入手可能)と10:1の割合で混合し、ポリエチレングリコール4000で細胞を融合させた。HAT培地に細胞を浮遊させ、96穴プレートにまき、融合細胞がクローン増殖してくるのを待った。スクリーニングは、あらかじめ精製HbA1cもしくはHbA0を固相化した96穴ELISAプレートに培養上清を反応させることにより行なった。PBS-Tで洗浄後POD標識抗マウスIgGを反応させ、洗浄後、o-フェニレンジアミンで発色させた。

【0101】より具体的には、スクリーニングは以下のように行なった。

【0102】96ウェルELISA用プレート(NUNC社製;NUNC-IMMUNOPLATE, MAXISORP F96(4-42404))にHbA1c(BioRex70による精製品)を、その濃度が5μg/mLになるように0.05Mクエン酸緩衝液(pH5.6)で希釈した後、各ウェルに50μLずつ分注した。このプレートを4℃で一晩放置してHbA1cをELISAプレートに固相化した。

【0103】このプレートにPBS-T (0.01M リン酸緩衝液、pH 6.8/0.15M NaCl/0.1% Tween 20) で4回洗浄した後、培養上清50μLを加え、室温(約25℃)で2時間放置して反応させた。PBS-Tで4回洗浄した後、POD(ペルオキシダーゼ)標識抗マウスIgG (CAPPEL社製; 3711-0081)をPBS-Tで2500倍希釈し、50μL加え、室温で1時間反応させた。PBS-Tで4回洗浄後、基質溶液(0.1% o-フェニレンジアミン/リン酸-クエン酸緩衝液(クエン酸1水和物7.3g、リン酸2ナトリウム12水和物23.9g、精製水1L/0.003% H₂O₂) 100μL加え、室温で30分間反応させた後、2N-硫酸を50μL加え、酵素反応を停止させた。

【0104】次いで、イムノプレートリーダー(ダイナテック社製、MR5000)を用いて上記酵素反応後の溶液の490nmにおける吸光度(OD)を求めた。

【0105】上記で用いたHbA1cに代えてHbA0 (BioRex70による精製品)を用いた以外は上記と同様に実施することにより、培養上清とHbA0との反応性を同様にOD値で求めることができた。

【0106】HbA1cと反応し、HbA0と反応しないウェルに、HbA1cと特異的に反応するモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマが存在することになる。

【0107】HbA1cと反応し、HbA0と反応しないウェルのハイブリドーマを限界希釈法でクローン化した。クローンを大量培養後、あらかじめ1週間前にプリスタン(シグマ社製、P1403)1mLを腹腔注射したBalb/cマウス(9~10週令)にハイブリドーマ1×10⁷ cellsを生食(生理食塩水)とともに腹腔注射し、腹水が腹腔中に充満したところで、モノクローナル抗体を腹水として採取した。

【0108】上記のELISAで用いた精製HbA1c、HbA0は以下のようにして得た。

【0109】すなわち、HbA1cが高値(10%以上)を示す検体(ヒト血液)を2500rpm 20分間遠心して血漿蛋白を除去した後、赤血球ペレットの5倍量の生理食塩水を加え、遠心洗浄を2回行った。遠心後の赤血球ペレットに等量の純水を加え、溶血させた。15,000rpm 45分間高速遠心し、沈澱物を除去した後、上清をBioRex70 (BioRad社製、200~400メッシュ、カラムサイズ28×255mm)を用いてHbA1cとHbA0を分画した(Trivelli, L. A., 他, New Engl. J. Med. 284, 353~357, (1971)参照)。各分画の純度をHPLCでチェックしたところ、HbA1cは80~90%、HbA0は99%以上であった。蛋白濃度の測定は、蛋白定量試薬(Pierce社製、BCA Protein Assay Reagent)を用い、添付のマニュアル通りに行った。

【0110】製造例2

(抗マウスIgGの作製) 第二抗体たる抗マウスIgGは、外部業者に委託して作製した。すなわち、精製マウスIgG (ZYMED Laboratories Inc. 品番02-6502)を完全フロインドアジュバントと共に、ヤギ皮下に免疫した。抗体価が64倍以上になるのを基準にして全採した。

【0111】実施例1

ヒトから採取した全血50μLに精製水2mLを加えて溶血させ、被検試料とした。

【0112】ポリスチレンチューブ中に、上記被検試料4μLを取り、これに粒径0.12μmラテックス(横水化学工業社製、「試薬用ラテックス 品番N-100」)を12.5mMグリシン緩衝液 pH 8.2 (18.8mM塩化ナトリウムを含む)で希釈して0.2%濃度としたラテックス懸濁液を200μL加え、37℃で20分間放置して、上記ラテックスに被検試料中のHbA1cを吸着させた。

【0113】次いで、上記ラテックス懸濁液に、製造例1で得たマウス腹水由来の抗HbA1cモノクローナル抗体と製造例2で得た抗マウスIgGやギ血清とをGBS-T (GBSにTween 20を0.3%溶かしたもの)で希釈し、混合して複合体としたものを200μL加え、37℃で20分間放置して、ラテックスの選択的凝集反応を行った。

【0114】HbA1c値が既知の検体をスタンダードとして同様に凝集反応を行い、分光光度計(ベックマン、DU-640)を用いて660nmの吸光度を測定し、標準曲線を求めた。このようにして求めたHbA1cの標準曲線を図1のグラフに示す。この標準曲線から、未知検体中のA1cのパーセント値を求めた。ラテックス法の対照法として、自動測定装置、Hi-Auto A1c HA-8121型(京都第一科学製)によるHPLC法でHbA1cを測定して、ラテックス法とHPLC法双方の測定値の相関を求めた。結果を図2のグラフに示す。図2においては、HPLC測定データはlabile HbA1cを含むA1c%を示した。図2に示すようにラテックス法とHPLC法との間には、良好な相関関係が見られた。

【0115】実施例2

製造例1で得た抗HbA1cモノクローナル抗体の倍々希釈系列を×1より×256倍希釈まで作り、これに製造例2で得た抗マウスIgG血清(第二抗体)の×10希釈液を同容量加え、攪拌して室温に静置することにより、モノクローナル抗体複合体を形成させた。4時間後の観察から、モノクローナル抗体×32希釈、×64希釈、としたところで最も多量の免疫沈降物がみられたことから、これらの希釈倍数でモノクローナル抗体と第二抗体の量が、格子状の免疫沈降物を形成するのに適した量比(すなわち最適比)になっていたことが判明した。

【0116】HbA1c 0%、8%、16%の溶血液4

μLを、実施例1と同様にラテックス200μLに吸着させ、上記の各モノクローナル抗体複合体をGBS-Tでさらに×16倍希釈した溶液を200μL加えて37℃で20分間反応させ、ラテックスを凝集させた。結果を図3のグラフに示す。本発明による凝集イムノアッセイに適したモノクローナル抗体複合体は、最適比よりもモノクローナル抗体が約8倍過剰に存在する複合体であった。

(0117) 実施例3

製造例1で得た抗HbA1cモノクローナル抗体の濃度を×8倍希釈の一定とし、第二抗体の濃度を×2倍希釈より×512倍希釈まで倍々希釈系列を作り、同容量ずつ加え、攪拌して室温に静置することにより、モノクローナル抗体複合体を形成させた。最も多量の免疫沈降物がみられた最適比は、第二抗体×2倍希釈、×4倍希釈のところであった。

(0118) 上記各モノクローナル抗体複合体をGBS-Tでさらに×8倍希釈した溶液を用いた以外は、実施例2と同様にしてラテックスを凝集させた。結果を図4のグラフに示す。本発明による凝集イムノアッセイ法に適したモノクローナル抗体複合体は、最適比よりも、モノクローナル抗体が約8倍過剰に存在する複合体であった。

(0119) 実施例4

製造例1で得た抗HbA1cモノクローナル抗体の複合体を、該モノクローナル抗体と抗マウスIgG抗体(第二抗体)の複合体という形とした場合と、ビオチン標識該モノクローナル抗体とアビジンDの複合体という形とした場合との相関を求めた。

(0120) ビオチン化試薬として、NHS-LC-Biotin(PIERCE社製、No. 21335)を用い、該試薬に添付のマニュアル通りに抗HbA1cモノクローナル抗体のビオチン化を行った。未反応のビオチンは、透析を繰り返すことにより除去した。アビジンDとしては、VECTOR社製のA-2000を用い、上記ビオチン標識モノクローナル抗体に加えることにより複合体化した。

(0121) 実施例1と同様にラテックスに被検試料中のHbA1cを吸着させた後、抗HbA1cモノクローナル抗体と抗マウスIgGヤギ血清(第二抗体)との複合体200μLを加え、さらに37℃で20分間反応させ、ラテックスの選択的凝集反応を行った。

(0122) 対照として、抗HbA1cモノクローナル抗体と抗マウスIgGヤギ血清との複合体に代えて、上記で得たビオチン標識HbA1cモノクローナル抗体とアビジンDとの複合体を加えた以外は、上記と同様にラテックスの選択的凝集反応を行った。

(0123) 結果を図5のグラフに示す。抗HbA1cモノクローナル抗体の複合体化の方法として抗マウスIgG抗体を用いた場合と、ビオチン-アビジン系の方法を

用いた場合とで、得られたA1c%値の間には良好な相関関係が認められた。

(0124) 実施例5

一晚4℃に放置した正常全血サンプルの上清である血漿を静かにビベットで分離することにより、下層の赤血球層を得た。この赤血球層を赤血球過多の全血検体とみなし、先に分離した血漿で倍々希釈系列(×1、×2、×4、×8、×16)を作った。これらをヘモグロビン濃度の異なる全血検体とみなし、それぞれ25μLに対して、0.5mL、1mL、2mLの精製水を加えて溶血させた。このように溶血させた検体のそれぞれ4μLを被検試料とした以外は、実施例1と同様にラテックスの選択的凝集反応を行い、660nmのOD値を測定した。

(0125) 得られた結果を図6のグラフに示す。被検試料4μLの場合、全血に20倍の精製水を加えて溶血したものは、ヘモグロビン濃度が低下するにしかたが660nmOD値が上昇しているのに対して、40倍の精製水を加えて溶血した場合には、ほぼ一定の660nmOD値を示しており、ヘモグロビン濃度の違いが測定値にあまり影響しないことが判明した。

(0126) また、干渉物質の影響(干渉チェックA、国際試薬社製、品番79290)を調べたところでは、乳ビ、ビリルビン共に、ほとんど本発明による凝集イムノアッセイ法には影響しなかった。

(0127) 実施例6

第一反応、すなわち被検試料と、ラテックス懸濁液との反応時間を2~30分間とした以外は実施例1と同様にしてラテックスの選択的凝集反応を行い、660nmのOD値を測定した。結果を図7のグラフに示す。ヘモグロビンA1cのラテックスへの吸着は、短時間に行なわれることが判明した。

(0128) 第二反応、すなわち抗ヘモグロビンA1cモノクローナル抗体と抗マウスIgG抗体(第二抗体)との複合体を反応させる時間を2~30分間とした以外は、実施例1と同様にしてラテックスの選択的凝集反応を行い、660nmのOD値を測定した。得られた結果を図8のグラフに示す。モノクローナル抗体複合体を用いることにより、ラテックスは短時間のうちに凝集することが判明した。

(0129) 実施例7

HbA1cおよびHbA0をそれぞれ生食(生理食塩水)で倍々に希釈して、希釈系列を作製した。

(0130) これらの希釈系列それぞれ100μLに対して、0.2Mグリシン緩衝液(pH2.5)を100μL加え、室温に5分間放置した。

(0131) そこにPBS-T(0.01Mリン酸緩衝液pH6.8/0.15M NaCl/0.1% Tween 20)を800μL加え攪拌したのち、その100μLに抗ヘモグロビンA1cモノクローナル抗体(倍

養上清、50倍希釈)を100 μ Lに加え、室温に30分間放置した。次いで、そのうちの100 μ Lを、あらかじめHbA1cを固相化した96ウェルプレート(5 μ g/mL、100 μ Lを96ウェルプレートに加え、4 $^{\circ}$ C一晩放置することにより固相化し、PBS-Tで4回洗浄したもの)に加え、室温で2時間反応させた。

【0132】PBS-Tで洗浄4回行なった後、POD(ペルオキシダーゼ)標識抗マウスIgG抗体(CAPEL社製、3711-0081)(5000倍希釈)を100 μ Lに加え、室温で1時間反応させた。

【0133】以降の操作は、モノクローナル抗体作製時のスクリーニングのときと同様に行なった。すなわち、基質反応を室温30分間行ない、停止液を加えて490nmのO.D値を測定した。以上の操作は、HbA1cもしくはHbA0を変性させて、それらが、抗HbA1cモノクローナル抗体が固相化されたHbA1cと反応するのを阻害するか否かを判定するためのものであった。

【0134】対照として、HbA1c、HbA0を未変性のまま反応させるため、グリシン緩衝液100 μ Lを加えるところを純水100 μ Lに変更した以外は、上記と同様の操作を繰り返して490nmのO.D値を測定した。

【0135】結果を図9のグラフに示す。図9に示すように、HbA1cを変性させると、抗HbA1cモノクローナル抗体と液相中で反応し、固相化されたHbA1cとの反応が阻害された。一方、変性させないHbA1cにはこのような阻害は認められず、抗HbA1cモノクローナル抗体とは液相中で反応しないことが判明した。また、HbA0は、変性の有無にかかわらず抗HbA1cモノクローナル抗体とは反応しなかった。

【0136】

【発明の効果】上述したように本発明によれば、被検試料中の抗原性物質を不溶性担体粒子に吸着させ、該抗原性物質に特異的に反応する抗体もしくは抗体複合体を反応させて不溶性担体粒子を選択的に凝集させることを特徴とする凝集イムノアッセイ法が提供される。

【0137】本発明の凝集イムノアッセイ法によれば、煩雑な前処理を行うことなく、簡便且つ迅速に被検試料中の抗原性物質の測定が可能となるため、同時に多数検体を並列的に処理することも極めて容易となる。加えて、このようなアッセイ法は、生化学自動分析機に好適に適用可能であるため、測定の自動化、大量処理が可能となる。

【0138】更に、本発明によればアッセイ法自体のみならず、試薬の製造という点についても有利な点がある。すなわち、一般に、ラテックス試薬(ラテックスに抗原、抗体等が結合されている)の製造は、同じ品質のものを作することは必ずしも容易ではない。また、保存中

に凝集や沈殿が生じるのを防ぐためのノウハウも必要である。一般に、ラテックス診断薬の価格のうちで素材ラテックスのコストは低く、試薬の価格の過半を占めるのは、生物材料と、それをラテックス粒子に被覆するための工程に要するコストである。

【0139】これに対し、本発明によれば、ラテックス等の不溶性担体に抗原や抗体は実質的に感作されておらず、市販の試薬用の不溶性担体(ラテックス等)をそのまま使用することも可能なため、新たな「ラテックス試薬」を製造することは必須でなくなる。加えて、本発明においては、抗体についても、必ずしも精製品である必要はなく、また、酵素標識などの操作も必要ないため、測定試薬の製造が容易となり、保存安定性の面でも極めて有利である。

【図面の簡単な説明】

【図1】本発明の凝集イムノアッセイ法によるHbA1cの標準曲線を示すグラフである。

【図2】HbA1cに関して、HPLC法と本発明の凝集イムノアッセイ法とによる測定値の相関を示すグラフである。

【図3】モノクローナル抗体の量を可変とし、第二抗体の量を一定とした際の、モノクローナル抗体複合体の反応性を示すグラフである。図中の矢印は最適比領域を示す。

【図4】モノクローナル抗体の量を一定とし、第二抗体の量を可変とした際の、モノクローナル抗体複合体の反応性を示すグラフである。図中の矢印は最適比領域を示す。

【図5】本発明による凝集イムノアッセイ法のうち、抗マウスIgG(第二抗体)で抗HbA1cモノクローナル抗体を複合体とした場合と、アビジンDでビオチン標識抗HbA1cモノクローナル抗体を複合体とした場合の測定値との相関を示すグラフである。

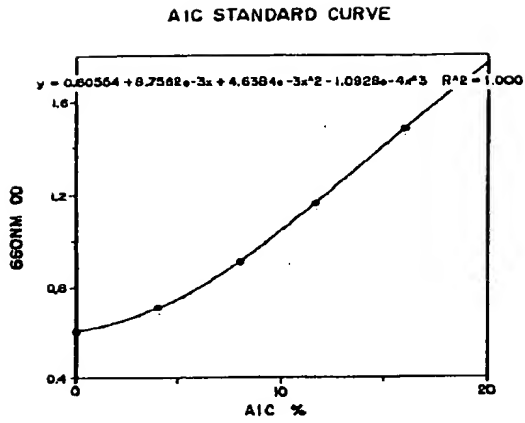
【図6】検体中の赤血球の量(すなわちヘモグロビン量)、および検体を溶血させるときの精製水の量が、本発明の凝集イムノアッセイ法による測定値に与える影響を説明するためのグラフである。

【図7】HbA1cをラテックスに吸着させる時間が、本発明の凝集イムノアッセイ法による測定値に与える影響を説明するためのグラフである。

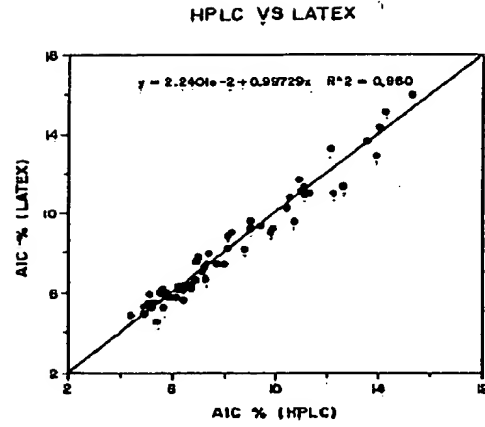
【図8】抗HbA1cモノクローナル抗体複合体を反応させる時間が、本発明の凝集イムノアッセイ法による測定値に与える影響を説明するためのグラフである。

【図9】抗HbA1cモノクローナル抗体がELISAプレートに固相化されたHbA1cと反応するが、液相中のHbA1cとは反応せず、液相中の変性させたHbA1cとは反応することを示すグラフである。

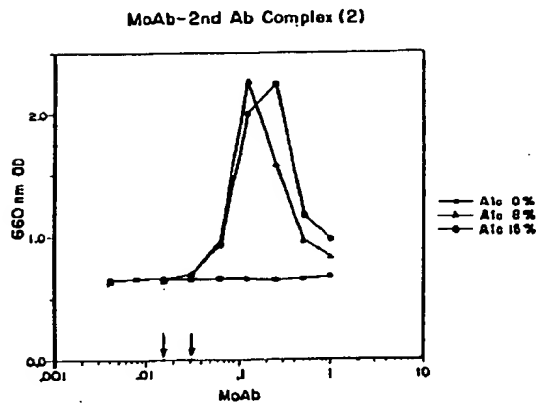
【図1】



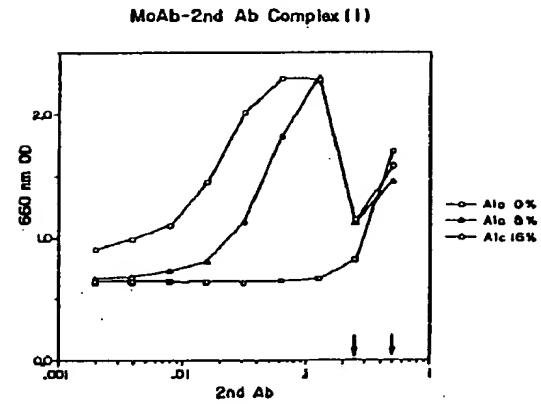
【図2】



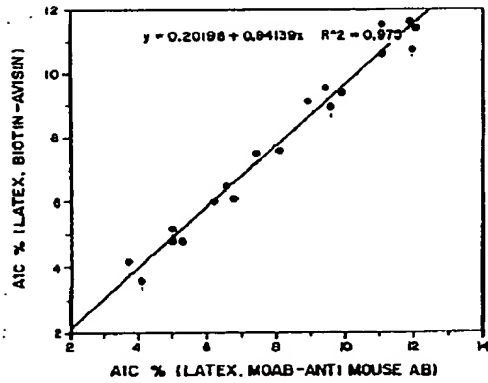
【図3】



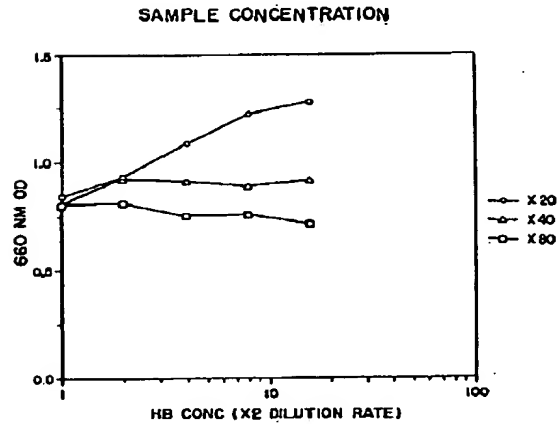
【図4】



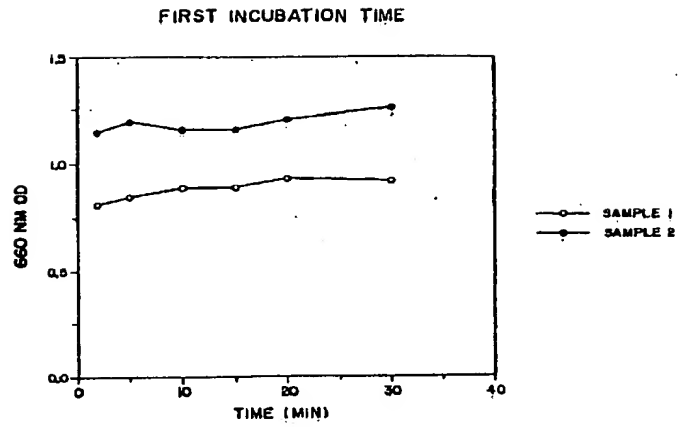
【図5】



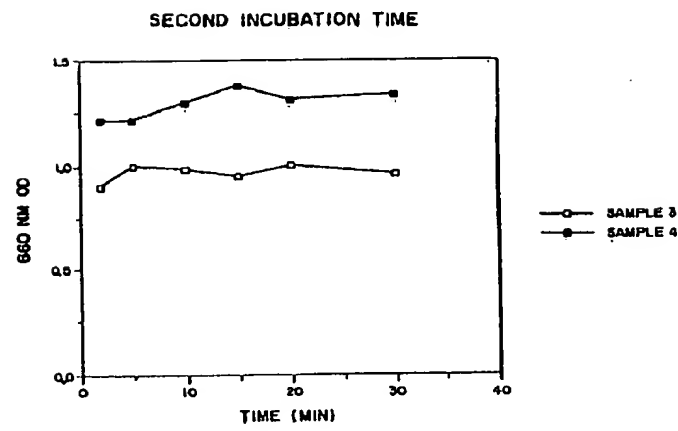
【図6】



【図7】



【図8】



〔図9〕

